FLEX
Monoclonal Mouse
Anti-Human
Epithelial Membrane Antigen
Clone E29
Ready-to-Use
(Dako Autostainer/Autostainer Plus)

Code IS629

ENGLISH

Intended use

For in vitro diagnostic use.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Membrane Antigen, Clone E29, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) is intended for use in immunohistochemistry together with Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments. This antibody is useful for the identification of epithelial cells in a wide variety of tissues and is a useful tool for the identification of neoplastic epithelia (1). EMA is present on the membrane of secretory epithelia. The absence of EMA staining with monoclonal mouse anti-human epithelial membrane antigen, clone E29 is considered to be strongly suggestive of non-epithelial neoplasia (2). The clinical interpretation of any staining or its absence should be complemented by morphological studies using proper controls and should be evaluated within the context of the patient's clinical history and other diagnostic tests by a qualified pathologist.

Summary and explanation

Epithelial membrane antigen (EMA) belongs to a heterogenous population of human milk fat globule (HMFG), proteins. HMFG is a complex secretory product of mammary epithelium and EMA can be recovered from the aqueous phase of skimmed milk following extraction in chloroform and methanol. Besides in milk, these proteins are present in a variety of epithelia of both normal and neoplastic types. A number of monoclonal and polyclonal antisera have been raised against these molecules and anti-EMA has been extensively studied in a large number of neoplastic conditions, most often in conjunction with other antibodies (2).

EMA is valuable as a marker in the detection of breast carcinoma metastases in histological sections of liver, lymph node, and bone marrow, and is useful for differentiating anaplastic carcinoma from malignant lymphomas, and for the recognition of spindle cell epithelial malignancies (1, 3).

Refer to Dako's *General Instructions for Immunohistochemical Staining* or the detection system instructions of IHC procedures for: 1) Principle of Procedure, 2) Materials Required, Not Supplied, 3) Storage, 4) Specimen Preparation, 5) Staining Procedure, 6) Quality Control, 7) Troubleshooting, 8) Interpretation of Staining, 9) General Limitations.

Reagent provided

Ready-to-Use monoclonal mouse antibody provided in liquid form in a buffer containing stabilizing protein and 0.015 mol/L NaN_3.

Clone: E29 Isotype: Ig2a, kappa

Immunogen

Human milk fat globule membrane preparation (1, 4).

Specificity

In Western blotting of the immunogen the antibody labels bands of 265-400 kDa (1).

Precautions

1. For professional users.
2. This product contains sodium azide (NaN_3), a chemical highly toxic in pure form. At product concentrations, though not classified as hazardous, sodium azide may react with lead and copper plumbing to form highly explosive build-ups of metal azides. Upon disposal, flush with large volumes of water to prevent metal azide build-up in plumbing.
3. As with any product derived from biological sources, proper handling procedures should be used.
4. Wear appropriate Personal Protective Equipment to avoid contact with eyes and skin.
5. Unused solution should be disposed of according to local, State and Federal regulations.

Storage

Store at 2-8 ℃. Do not use after expiration date sta mped on vial. If reagents are stored under any conditions other than those specified, the conditions must be verified by the user. There are no obvious signs to indicate instability of this product. Therefore, positive and negative controls should be run simultaneously with patient specimens. If unexpected staining is observed which cannot be explained by variations in laboratory procedures and a problem with the antibody is suspected, contact Dako Technical Support.

Specimen preparation including materials required but not supplied

The antibody can be used for labeling formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections. Tissue specimens should be cut into sections of approximately 4 µm.

Pre-treatment with heat-induced epitope retrieval (HIER) is required using Dako PT Link (Code PT100/PT101). For details, please refer to the PT Link User Guide. Optimal results are obtained by pretreating tissues using EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004).

Paraffin-embedded sections: Pre-treatment of formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using the 3-in-1 specimen preparation procedure for Dako PT Link. Follow the pre-treatment procedure outlined in the package insert for EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code K8010/K8004). Note: After staining the sections must be dehydrated, cleared and mounted using permanent mounting medium.

Deparaffinized sections: Pre-treatment of deparaffinized formalin-fixed, paraffin-embedded tissue sections is recommended using Dako PT Link and following the same procedure as described for paraffin-embedded sections. After staining the slides should be mounted using aqueous or permanent mounting medium.

The tissue sections should not dry out during the treatment or during the following immunohistochemical staining procedure. For greater adherence of tissue sections to glass slides, the use of FLEX IHC Microscope Slides (Code K8020) is recommended.

Staining procedure including materials required but not supplied

The recommended visualization system is EnVision™ FLEX High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code K8010). The staining steps and incubation times are pre-programmed into the software of Dako Autostainer/Autostainer Plus instruments, using the following protocols:

Template protocol: FLEXRTU2 (200 µL dispense volume) or FLEXRTU3 (300 µL dispense volume)
Autoprogram: EMA (without counterstaining) or EMAH (with counterstaining)

The Auxiliary step should be set to "rinse buffer" in staining runs with ≤10 slides. For staining runs with >10 slides the Auxiliary step should be set to "none". This ascertains comparable wash times.

All incubation steps should be performed at room temperature. For details, please refer to the Operator's Manual for the dedicated instrument. If the protocols are not available on the used Dako Autostainer platform, please contact Dako Technical Services.

Optimal conditions may vary depending on specimen and preparation methods, and should be determined by each individual laboratory. If the evaluating pathologist should desire a different staining intensity, a Dako Application Specialist/Technical Service Specialist can be contacted for information on re-programming of the protocol. Verify that the performance of the adjusted protocol is still valid by evaluating that the staining pattern is identical to the staining pattern described in "Performance characteristics".
Counterstaining in hematoxylin is recommended using EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (K8018). Non-aqueous, permanent mounting medium is recommended.

Positive and negative controls should be run simultaneously using the same protocol as the patient specimens. The positive control tissue should include tonsil and the cells/structures should display reaction patterns as described for this tissue in "Performance characteristics" in all positive specimens. The recommended negative control reagent is FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code IS750).

Staining interpretation

The cellular staining pattern is cytoplasmic and membranous.

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Performance characteristics

Normal tissues: The antibody labels epithelial cells in a wide variety of tissues and mesothelial cells. Included are sweat ducts and sebaceous glands of the skin, epithelium of the gastrointestinal tract, acini and ducts of the breast, exocrine cells in pancreas, bladder epithelium, distal tubules of the kidney, cervix, endometrium, respiratory epithelium, thyroid and bile ducts. No labeling was observed in epidermis, endocrine cells in pancreas, glomeruli and proximal tubules of the kidney, central nervous system, peripheral nervous system, connective tissue, hepatocytes, and lymphoid tissue, except for occasional plasma cells (1).

Abnormal tissues: Adenocarcinomas of the kidney, breast, colon, stomach, pancreas, lung, endometrium and ovary were all positive with immunocytochemical use of anti-EMA, E29. Staining patterns were mostly cytoplasmic but apical reactivity and peripheral membraneous and intracellular luminal staining was also noted (6). Also positive for the antibody were squamous cell, transitional cell, and small cell anaplastic carcinomas, and mesotheliomas (6). The antibody also showed reactivity with somatic tumors (7), renal cell carcinomas (8, 9), meningiomas (10), classic chordoma (11), and neuroendocrine (Merkel cell) carcinoma (12). Tumors and neoplasms that are nonreactive with anti-EMA, E29 include: basal cell carcinoma (3), seminomas (7), embryonal carcinomas (7), schwannomas (10), leiomyosarcoma of the bladder (13), epithelioid leiomyosarcomas of the skin and subcutaneous tissues (14), capillary hemangioblastomas (8), ovarian granulosa cell tumors (15) and angiosarcomatous neoplasms of the thyroid (15).

FRANÇAIS

Utilisation prévue

Pour utilisation diagnostique *in vitro.*

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Membrane Antigen, Clone E29, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) est destiné à une utilisation en immunohistochimie avec les instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus. Cet anticorps facilite l'identification des cellules épithéliales dans un grand nombre de tissus et constitue un outil utile pour l'identification des épithéliums néoplasiques (1). L'EMA est présent sur la membrane des épithéliums sécrétoires. L'absence de coloration de l'EMA à l'anticorps monoclonal de souris dirigé contre l'antigène de la membrane épithéliale humain (EMA), clone E29 est considérée comme une forte indication d'une néoplasie non épithéliale (2). L'interprétation clinique de toute coloration ou son absence doit être complétée par des études morphologiques en utilisant des contrôles appropriés et doit être évaluée en fonction des antécédents cliniques du patient et d'autres tests diagnostiques par un pathologiste qualifié.

Résumé et explication

L'antigène de la membrane épithéliale (EMA) appartient à une population hétérogène de protéines de globules gras de lait humain (HMFG). Les HMFG sont un produit sécrétoire complexe de l'épithélium mammaire et l'EMA est présent dans le lait écrémé en phase aqueuse après extraction dans du chloroforme et du méthanol. Outre le lait, ces protéines sont également présentes dans un grand nombre d'épithéliums à la fois de types normaux et néoplasiques. Plusieurs anti-sérums monoclonaux et polyclonaux ont été testés sur ces molécules et l'anti-EMA a été largement étudié dans un grand nombre de conditions néoplasiques, le plus souvent en association avec d'autres anticorps (2).

L'EMA est un important marqueur de détection des métastases du carcinome mammaire dans les coupes histologiques du foie, des ganglions lymphatiques et de la moelle osseuse, et est utile pour la différenciation des carcinomes anaplasiques et des lymphomes malins, ainsi que pour la reconnaissance des tumeurs épithéliales à cellules fusiformes (1, 3).

Se référer aux *Instructions générales de coloration immunohistochimique* de Dako ou aux instructions du système de détection relatives aux procédures IHC pour plus d'informations concernant les points suivants : 1) Principe de procédure, 2) Matériels requis mais non fournis, 3) Conservation, 4) Préparation des échantillons, 5) Procédure de coloration, 6) Contrôle qualité, 7) Dépannage, 8) Interprétation de la coloration, 9) Limites générales.

Réactifs fournis

Anticorps monoclonal de souris prêt à l'emploi fourni sous forme liquide dans un tampon contenant une protéine stabilisante et 0,015 mol/L de NaN_3.

Clone : E29 Isotype : Ig2a, kappa

Immunogène

Préparation de membrane de globules gras de lait humain (1, 4).

Spécificité

Dans les analyses par Western blot de l'immunogène, l'anticorps marque des bandes de 265 à 400 kDa (1).

Précautions

1. Pour utilisateurs professionnels.
2. Ce produit contient de l'azide de sodium (NaN_3), produit chimique hautement toxique dans sa forme pure. Aux concentrations du produit, bien que non classé comme dangereux, l'azide de sodium peut réagir avec le cuivre et le plomb des canalisations et former des accumulations d'azides métalliques hautement explosives. Lors de l'élimination, rincer abondamment à l'eau pour éviter toute accumulation d'azide métallique dans les canalisations.
3. Comme avec tout produit d'origine biologique, des procédures de manipulation appropriées doivent être respectées.
4. Porter un vêtement de protection approprié pour éviter le contact avec les yeux et la peau.
5. Les solutions non utilisées doivent être éliminées conformément aux réglementations locales et nationales.

Conservation

Conserver entre 2 et 8 °C. Ne pas utiliser après la date de péremption indiquée sur le flacon. Si les réactifs sont conservés dans des conditions autres que celles indiquées, celles-ci doivent être validées par l'utilisateur. Il n'y a aucun signe évident indiquant l'instabilité de ce produit. Par conséquent, des contrôles positifs et négatifs doivent être testés en même temps que les échantillons de patient. Si une coloration inattendue est observée, qui ne peut être expliquée par un changement des procédures du laboratoire, et en cas de suspicion d'un problème lié à l'anticorps, contacter l'assistance technique de Dako.

Préparation des échantillons y compris le matériel requis mais non fourni

L'anticorps peut être utilisé pour le marquage des coupes de tissus inclus en paraffine et fixés au formol. L'épaisseur des coupes d'échantillons de tissu doit être d'environ 4 µm.

Un prétraitement avec démasquage d'épitope induit par la chaleur (HIER) est nécessaire avec le Dako PT Link (Réf. PT100/PT101). Pour plus de détails, se référer au Guide d'utilisation du PT Link. Des résultats optimaux sont obtenus en prétraitant les tissus à l'aide de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004).

Coupes incluses en paraffine : le prétraitement des coupes tissulaires fixées au formol et incluses en paraffine est recommandé à l'aide de la procédure de préparation d'échantillon 3-en-un pour le Dako PT Link. Suivre la procédure de prétraitement indiquée dans la notice de la EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Réf. K8010/K8004). Remarque : après coloration, les coupes doivent être déshydratées, lavées et montées à l'aide d'un milieu de montage permanent.

Coupes déparaffinées : le prétraitement des coupes tissulaires déparaffinées, fixées au formol et incluses en paraffine, est recommandé à l'aide du Dako PT Link, en suivant la même procédure que pour les coupes incluses en paraffine. Après coloration, un montage aqueux ou permanent des lames est recommandé.

Les coupes de tissus ne doivent pas sécher lors du traitement ni lors de la procédure de coloration immunohistochimique suivante. Pour une meilleure adhérence des coupes de tissus sur les lames de verre, il est recommandé d'utiliser des lames FLEX IHC Microscope Slides (Réf. K8020).

Procédure de coloration y compris le matériel requis mais non fourni

Le système de visualisation recommandé est le EnVision™ FLEX, High pH, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8010). Les étapes de coloration et d'incubation sont préprogrammées dans le logiciel des instruments Dako Autostainer/Autostainer Plus, à l'aide des protocoles suivants :

Protocole modèle : FLEXRTU2 (volume de distribution de 200 µL) ou FLEXRTU3 (volume de distribution de 300 µL)
Autoprogram : EMA (sans contre-coloration) ou EMAH (avec contre-coloration)

L'étape Auxiliary doit être réglée sur « rinse buffer » lors des cycles de coloration avec ≤10 lames. Pour les cycles de coloration de >10 lames, l'étape Auxiliary doit être réglée sur « none ». Cela garantit des temps de lavage comparables.
Toutes les étapes d'incubation doivent être effectuées à température ambiante. Pour plus de détails, se référer au Manuel de l'opérateur spécifique à l'instrument. Si les protocoles ne sont pas disponibles sur la plateforme Dako Autostainer utilisée, contacter le service technique de Dako.

Les conditions optimales peuvent varier en fonction du prélèvement et des méthodes de préparation, et doivent être déterminées par chaque laboratoire individuellement. Si le pathologiste qui réalise l'évaluation désire une intensité de coloration différente, un spécialiste d'application/spécialiste du service technique de Dako peut être contacté pour obtenir des informations sur la re-programmation du protocole. Vérifier que l'exécution du protocole modifié est toujours valide en vérifiant que le schéma de coloration est identique au schéma de coloration décrit dans les « Caractéristiques de performance ».

Il est recommandé d'effectuer une contre-coloration à l'aide de EnVision™ FLEX Hematoxylin (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. K8018). L'utilisation d'un milieu de montage permanent non aqueux est recommandée.

Des contrôles positifs et négatifs doivent être réalisés en même temps et avec le même protocole que les échantillons du patient. Le contrôle de tissu

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

positif doit comprendre l'amygdale et les cellules/structures doivent présenter des schémas de réaction tels que décrits pour ces tissus dans les « Caractéristiques de performance » pour tous les échantillons positifs. Le contrôle négatif recommandé est le FLEX Negative Control, Mouse, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Réf. IS750).

Interprétation de la coloration

Le schéma de coloration cellulaire est cytoplasmique et membranaire.

Caractéristiques de performance

Tissus sains : L'anticorps marque les cellules épithéliales d'un grand nombre de tissus et de cellules mésothéliales. Figurent notamment : les canaux sudoripares et les glandes sébacées de la peau, l'épithélium de l'appareil digestif, les acini et canaux mammaires, les cellules exocrines du pancréas, l'épithélium de la vessie, les tubules distaux du rein, le col de l'utérus, l'endomètre, l'épithélium respiratoire, la thyroïde et les canaux biliaires. Aucun marquage n'a été observé au niveau de l'épiderme, des cellules endocrines du pancréas, des glomérules et des tubules proximaux du rein, du système nerveux central, du système nerveux périphérique, du tissu conjonctif, des hépatocytes, et du tissu lymphoïde, à l'exception de quelques cellules plasmatiques (1).

Tissus tumoraux : Les adénocarcinomes du rein, du sein, du côlon, de l'estomac, du pancréas, du poumon, de l'endomètre et de l'ovaire étaient tous positifs lors de l'analyse immunocytochimique utilisant l'anti-EMA, E29. Les schémas de coloration étaient principalement cytoplasmiques mais une réactivité apicale et une coloration luminale intracellulaire et membranaire périphérique a également été notée (6). Sont également positifs à l'anticorps : les carcinomes anaplasiques à petites cellules, à cellules squameuses et à cellules transitionnelles, ainsi que les mésothéliomes (6). L'anticorps présentait également une réactivité dans les cas de tumeurs somatiques (7), de carcinomes des cellules rénales (8, 9), de méningiomes (10), de chordome classique (11) et de carcinome neuroendocrine (cellules de Merkel) (12). Les tumeurs et les néoplasmes non réactifs à l'anti-EMA, E29 sont notamment : le carcinome des cellules basales (3), les séminomes (7), les carcinomes embryonnaires (7), les schwannomes (10), les léiomyosarcomes de la vessie (13), les léiomyosarcomes épithélioïdes de la peau et des tissus sous-cutanés (14), les hémangioblastomes capillaires (8), les tumeurs des cellules de la granulosa ovarienne (15) et les néoplasmes angiosarcomateux de la thyroïde (15).

DEUTSCH

Zweckbestimmung

Zur In-vitro-Diagnostik.

FLEX Monoclonal Mouse Anti-Human Epithelial Membrane Antigen, Clone E29, Ready-to-Use, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) ist zur Verwendung in der Immunhistochemie in Verbindung mit Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräten bestimmt. Dieser Antikörper markiert Epithelzellen unterschiedlichster Gewebe und dient zur Identifizierung neoplastischer Epithelien (1). EMA ist auf der Membran sekretorischen Epithelgewebes vorhanden. Das Fehlen einer EMA-Färbung mit monoklonalem Maus-Anti-Human-Epithelmembran-Antigen (EMA), Klon E29 gilt als deutliches Anzeichen für eine nicht-epitheliale Neoplasie (2). Die klinische Auswertung einer eventuell eintretenden Färbung sollte durch morphologische Studien mit ordnungsgemäßen Kontrollen ergänzt werden und von einem qualifizierten Pathologen unter Berücksichtigung der Krankengeschichte und anderer Diagnostiktests des Patienten vorgenommen werden.

Zusammenfassung und Erklärung

Das Epithelmembran-Antigen (EMA) gehört einer heterogenen Population menschlicher Milchfettglobuline (HMFG, human milk fat globule proteins) an. HMFG ist ein komplexes Sekretionsprodukt des menschlichen Milchdrüsenepithels. EMA kann von der wässrigen Phase der Magermilch nach Extraktion in Chloroform und Methanol rückgewonnen werden. Außer in der Milch sind diese Proteine in diversen Epithelzellen in sowohl gesunden als auch neoplastischen Geweben vorhanden. Verschiedene monoklonale und polyklonale Antiseren wurden gegen diese Moleküle entwickelt und Anti-EMA wurde ausgiebig bei einer großen Anzahl neoplastischer Erkrankungen untersucht, und zwar am häufigsten in Kombination mit anderen Antikörpern (2).

EMA ist ein wertvoller Marker beim Nachweis von Metastasen des Mammakarzinoms in histologischen Schnitten von Leber, Lymphknoten und Knochenmark und ist auch hilfreich bei der Abgrenzung eines anaplastischen Karzinoms von einem malignen Lymphom sowie bei der Erkennung von malignen epithelialen Spindelzellentartungen (1, 3).

Folgende Angaben bitte den *Allgemeinen Richtlinien zur immunhistochemischen Färbung* von Dako oder den Anweisungen des Detektionssystems für IHC-Verfahren entnehmen: 1) Verfahrensprinzip, 2) Erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien, 3) Aufbewahrung, 4) Vorbereitung der Probe, 5) Färbeverfahren, 6) Qualitätskontrolle, 7) Fehlersuche und -behebung, 8) Auswertung der Färbung, 9) Allgemeine Beschränkungen.

Geliefertes Reagenz

Gebrauchsfertiger, monoklonaler Maus-Antikörper in flüssiger Form in einem Puffer, der stabilisierendes Protein und 0,015 mol/L NaN_3 enthält.

Klon: E29 Isotyp: Ig2a, Kappa

Immunogen

HMFG-Membranpräparat (1, 4).

Spezifität

Beim Western Blotting markiert der Antikörper Banden zwischen 265 und 400 kDa (1).

Vorsichtsmaßnahmen

1. Nur für Fachpersonal bestimmt.
2. Dieses Produkt enthält Natriumazid (NaN_3), eine in reiner Form äußerst giftige Chemikalie. Natriumazid kann auch in als ungefährlich eingestuften Konzentrationen mit Blei- und Kupferrohren reagieren und hochexplosive Metallazide bilden. Nach der Entsorgung stets mit viel Wasser nachspülen, um Metallazidansammlungen in den Leitungen vorzubeugen.
3. Wie alle Produkte biologischen Ursprungs müssen auch diese entsprechend gehandhabt werden.
4. Geeignete Schutzkleidung tragen, um Augen- und Hautkontakt zu vermeiden.
5. Nicht verwendete Lösung ist entsprechend örtlichen, bundesstaatlichen und staatlichen Richtlinien zu entsorgen.

Lagerung

Bei 2–8 °C aufbewahren. Nach Ablauf des auf dem Fläschchen aufgedruckten Verfalldatums nicht mehr verwenden. Werden die Reagenzien unter anderen als den angegebenen Bedingungen aufbewahrt, müssen diese Bedingungen vom Benutzer validiert werden. Es gibt keine offensichtlichen Anzeichen für eine eventuelle Produktinstabilität. Positiv- und Negativkontrollen sollten daher zur gleichen Zeit wie die Patientenproben getestet werden. Falls es zu einer unerwarteten Färbung kommt, die sich nicht durch Unterschiede bei Laborverfahren erklären lässt und auf ein Problem mit dem Antikörper hindeutet, ist der technische Kundendienst von Dako zu verständigen.

Vorbereitung der Probe und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Der Antikörper eignet sich zur Markierung von formalinfixierten und paraffineingebetteten Gewebeschnitten. Gewebeproben sollten in Schnitte von ca. 4 µm Stärke geschnitten werden.

Die Vorbehandlung durch hitzeinduzierte Epitopdemaskierung (HIER) mit Dako PT Link (Code-Nr. PT100/PT101) ist erforderlich. Weitere Informationen hierzu siehe PT Link-Benutzerhandbuch. Optimale Ergebnisse können durch Vorbehandlung der Gewebe mit EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) erzielt werden.

Paraffineingebettete Schnitte: Die Vorbehandlung der formalinfixierten, paraffineingebetteten Schnitte mit dem 3-in-1-Probenvorbereitungsverfahren für Dako PT Link wird empfohlen. Vorbehandlung gemäß der Beschreibung in der Packungsbeilage für EnVision™ FLEX Target Retrieval Solution, High pH (50x) (Code-Nr. K8010/K8004) durchführen. Hinweis: Nach dem Färben müssen die Schnitte dehydriert, geklärt und mit permanentem Einbettmedium auf den Objektträger aufgebracht werden.

Entparaffinierte Schnitte: Eine Vorbehandlung der entparaffinierten, formalinfixierten, paraffineingebetteten Gewebeschnitte mit Dako PT Link nach demselben Verfahren, wie für die paraffineingebetteten Schnitte beschrieben, wird empfohlen. Die Objektträger nach dem Färben mit einem wässrigen oder permanenten Einbettmedium bedecken.

Die Gewebeschnitte dürfen während der Behandlung oder des anschließenden immunhistochemischen Färbeverfahrens nicht austrocknen. Zur besseren Haftung der Gewebeschnitte an den Glasobjektträgern wird die Verwendung von FLEX IHC Microscope Slides (Code-Nr. K8020) empfohlen.

Färbeverfahren und erforderliche, aber nicht mitgelieferte Materialien

Das empfohlene Visualisierungssystem ist EnVision™ FLEX, High pH (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8010). Die Färbeschritte und Inkubationszeiten sind in der Software der Dako Autostainer/Autostainer Plus-Geräte mit den folgenden Protokollen vorprogrammiert:

Matrix-Protokoll: FLEXRTU2 (200 µL Abgabevolumen) oder FLEXRTU3 (300 µL Abgabevolumen)
Autoprogram: EMA (ohne Gegenfärbung) oder EMAH (mit Gegenfärbung)

Bei Färbedurchläufen mit höchstens 10 Objektträgern sollte der „Zusatz"-Schritt auf „Pufferspülgang" eingestellt werden. Für Färbedurchläufe mit mehr als 10 Objektträgern den „Zusatz"-Schritt auf „Keine" einstellen. Dieses gewährleistet vergleichbare Waschzeiten.

Alle Inkubationsschritte sollten bei Raumtemperatur durchgeführt werden. Nähere Einzelheiten bitte dem Benutzerhandbuch für das jeweilige Gerät entnehmen. Wenn die Färbeprotokolle auf dem verwendeten Dako Autostainer-Gerät nicht verfügbar sind, bitte den Technischen Kundendienst von

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17

Dako verständigen.

Optimale Bedingungen können je nach Probe und Präparationsverfahren unterschiedlich sein und sollten vom jeweiligen Labor selbst ermittelt werden. Falls der beurteilende Pathologe eine andere Färbungsintensität wünscht, kann ein Anwendungsspezialist oder Kundendiensttechniker von Dako bei der Neuprogrammierung des Protokolls helfen. Die Leistung des angepassten Protokolls muss verifiziert werden, indem gewährleistet wird, dass das Färbemuster mit dem unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Färbemuster identisch ist.

Die Gegenfärbung in Hämatoxylin sollte mit EnVision™ FLEX Hematoxylin, (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. K8018) ausgeführt werden. Empfohlen wird ein nichtwässriges, permanentes Fixiermittel.

Positiv- und Negativkontrollen sollten zur gleichen Zeit und mit demselben Protokoll wie die Patientenproben getestet werden. Das positive Kontrollgewebe sollte Mandelgewebe enthalten und die Zellen/Strukturen müssen in allen positiven Proben die für dieses Gewebe unter „Leistungsmerkmale" beschriebenen Reaktionsmuster aufweisen. Das empfohlene Negativ-Kontrollreagenz ist FLEX Negative Control, Mouse (Dako Autostainer/Autostainer Plus) (Code-Nr. IS750).

Auswertung der Färbung

Das zelluläre Färbemuster ist zytoplasmatisch und membranös.

Leistungsmerkmale

Gesundes Gewebe: Der Antikörper markiert Epithelzellen in einer Vielfalt unterschiedlicher Gewebe und Mesothelzellen. Hierzu zählen: Schweißdrüsengänge und Talgdrüsen der Haut, Epithel des Gastrointestinaltrakts, Acini und Gänge der Brust, exokrine Pankreaszellen, Blasenepithel, distale Nierentubuli, Zervix, Endometrium, Epithel der Atemwege, Schilddrüse und Gallengänge. Bei folgenden Geweben konnte keine Markierung festgestellt werden: Epidermis, endokrine Pankreaszellen, Glomeruli und proximale Nierentubuli, zentrales und peripheres Nervensystem, Bindegewebe, Hepatozyten sowie lymphoides Gewebe mit Ausnahme gelegentlicher Plasmazellen (1).

Pathologisches Gewebe: In immunzytochemischen Verfahren mit Anti-EMA, E29 ergaben alle Adenokarzinome in Niere, Brust, Darm, Magen, Pankreas, Lunge, Endometrium und Eierstöcken positive Resultate. Die Färbemuster waren überwiegend zytoplasmatisch, allerdings wurden auch Färbungen der apikalen und peripheren Membran sowie eine intrazellulär-luminale Färbung beschrieben (6). Ebenfalls positiv für den Antikörper waren Plattenepithel-, Übergangsepithel- und kleinzellige anaplastische Karzinome sowie Mesotheliome (6). Der Antikörper zeigte zudem eine Reaktivität mit somatischen Tumoren (7), renalen Zellkarzinomen (8, 9), Meningiomen (10), Chordomen (11) und neuroendokrinen (Merkel'sche Tastzellen-) Karzinomen (12). Zu den mit Anti-EMA, E29 nicht-reaktiven Tumoren und Neoplasmen gehören: Basalzellenkarzinome (3), Seminome (7), embryonale Karzinome (7), Schwannome (10), Blasenleiomyosarkome (13), Epitheloid-Leiomyosarkome der Haut und des Unterhautgewebes (14), Hämangioblastome der Kapillaren (8), Granulosazelltumore der Eierstöcke (15) und Angiosarkom-ähnliche Neoplasmen der Schilddrüse (15).

References/ Références/ Literatur

1. Cordell J, Richardson TC, Pulford KAF, Ghosh AK, Gatter KC, Heyderman E, et al. Production of monoclonal antibodies against human epithelial membrane antigen for use in diagnostic immunocytochemistry. Br J Cancer 1985;52:347-54.
2. Gatter KC, Heryet A, Alcock C, Mason DY. Clinical importance of analyzing malignant tumors of uncertain origin with immunohistological techniques. Lancet 1985; June:1302.
3. Swanson PE. Monoclonal antibodies to human milk fat globule proteins. In: Wick MR, Siegal GP, editors. Monoclonal antibodies in diagnostic immunohistochemistry. New York – Basel: Marcell Dekker Inc; 1988. p. 227-83.
4. Sloane JP, Ormerod MG. Distribution of epithelial membrane antigen in normal and neoplastic tissues and its value in diagnostic tumor pathology. Cancer 1981:47:1786-95.
5. Heyderman E, Strudley I, Powell G, Richardson TC, Cordell JL, Mason DY. A new monoclonal antibody to epithelial membrane antigen (EMA) – E29. A comparison of its immunocytochemical reactivity with polyclonal anti-EMA antibodies and with another monoclonal antibody, HMFG-2. Br J Cancer 1985;52:355-61.
6. Pinkus GS, Kurtin PJ. Epithelial membrane antigen – a diagnostic discriminant in surgical pathology. Immunohistochemical profile in epithelial, mesenchymal, and hematopoietic neoplasms using paraffin sections and monoclonal antibodies. Hum Pathol 1985;16:929-40.
7. Wick MR, Swanson PE, Manivel JC. Placental-like alkaline phosphatase reactivity in human tumors: An immunohistochemical study of 520 cases. Hum Pathol 1987; 18:946.
8. Hufnagel TJ, Kim JH, True LD, Manuelidis EE. Immunohistochemistry of capillary hemangioblastoma – Immunoperoxidase-labeled antibody staining resolves the differential diagnosis with metastatic renal cell carcinoma, but does not explain the histogenesis of the capillary hemangioblastoma. Amer J Surg Pathol 1989; 13:207.
9. Coffin CM, Swanson PE, Wick MR, Dehner LP. An immunohistochemical comparison of chordoma with renal cell carcinoma, colorectal adenocarcinoma, and myzopapillary ependymoma: A potential diagnostic dilemma in the diminutive biopsy. Mod Pathol 1993; 6:531.
10. Schnitt SJ and Vogel H. Meningiomas: Diagnostic value of immunoperoxidase staining for epithelial membrane antigen. Amer J Surg Pathol 1986; 10:640.
11. Walker WP, Landas SK, Bromley CM, Sturm MTM. Immunohisto-chemical distinction of classic and chondroid chordomas. Mod Pathol 1991; 4:661.
12. Smith KH, Skelton HG, Holland TT, Morgan AM, Lupton GP. Neuroendocrine (Merkel Cell) carcinoma with an intraepidermal component. Amer J Dermatopathol 1993; 15:528.
13. Mills SE, Bova GS, Wick MR, Young RH. Leiomyosarcoma of the urinary bladder – A clinicopathologic and immunohistochemical study of 15 cases. Amer J Surg Pathol 1989; 13:480.
14. Suster S. Epithelioid leiomyosarcoma of the skin and subcutaneous tissue. Amer J Surg Pathol 1994; 18:232
15. Mills SE, Gaffey MJ, Watts JC, Swanson PE, Wick MR, Kivolsi VA, Nappi O, Weiss LM. Angiomatoid carcinoma and 'Angiosarcoma' of the thyroid gland. Anatomic Pathol 1994; 102:322.

Explanation of symbols/ Explication des symboles/ Erläuterung der Symbole

REF	Catalogue number Référence catalogue Bestellnummer	2 °C – 8 °C	Temperature limitation Limites de température Zulässiger Temperaturbereich		Use by Utiliser avant Verwendbar bis
IVD	In vitro diagnostic medical device Dispositif médical de diagnostic in vitro In-vitro-Diagnostikum	Σ	Contains sufficient for <n> tests Contenu suffisant pour <n> tests Inhalt ausreichend für <n> Tests		Manufacturer Fabricant Hersteller
	Consult instructions for use Voir les instructions d'utilisation Gebrauchsanweisung beachten	LOT	Batch code Numéro de lot Chargenbezeichnung		

Dako Denmark A/S | Produktionsvej 42 | DK-2600 Glostrup | Denmark | Tel. +45 44 85 95 00 | Fax +45 44 85 95 95 | CVR No. 33 21 13 17